

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **01214760 A**

(43) Date of publication of application: **29 . 08 . 89**

(51) Int. Cl. **G01N 33/543**

(21) Application number: **63038595**

(22) Date of filing: **23 . 02 . 88**

(71) Applicant: **TEIKOKU HORMONE MFG CO LTD**

(72) Inventor:  
**MANITA HIDEAKI**  
**MATSUSHIMA TOSHIKO**  
**NONAKA KAZUHIKO**  
**SASAMOTO HIDEHIKO**

**(54) SIMPLE IMMUNOLOGICAL MEASURING METHOD**

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To make it possible to perform highly sensitive measurement, by supporting the composite material of antigen and antibody that is reacted with a first antibody supported on a porous carrier film having a larger hole diameter than the diameter of a latex grain on a latex grain having the different color from said carrier film, and making said composite material react with a second antibody.

**CONSTITUTION:** Antigen such as peptide hormone is incorporated in a liquid to be checked. The antigen is

caused to react with a monoclonal antibody e.g., a first monoclonal antibody that is supported on a porous carrier such as filter paper having the larger hole diameter than the diameter of a latex grain. The yielded composite material of antigen and antibody is supported on a latex grain having the different color from a carrier film. The composite material is caused to react with a second monoclonal antibody whose antigen determining group is different from the first monoclonal antibody. In this way, the antigen in the liquid to be checked can be measured highly sensitivity.

**COPYRIGHT:** (C)1989,JPO&Japio

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-214760

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)8月29日

G 01 N 33/543

E-7906-2G

Q-7906-2G

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 免疫学的簡易測定方法

⑯ 特 願 昭63-38595

⑰ 出 願 昭63(1988)2月23日

⑱ 発 明 者 真 仁 田 英 明 神奈川県相模原市御園1-11-20  
 ⑱ 発 明 者 松 嶋 俊 子 神奈川県横浜市保土ヶ谷区天王町2-42-2  
 ⑱ 発 明 者 野 中 和 彦 東京都日野市多摩平6-12-19  
 ⑱ 発 明 者 笹 本 英 彦 東京都杉並区永福3-26-8  
 ⑲ 出 願 人 帝国臓器製薬株式会社 東京都港区赤坂2丁目5番1号  
 ⑳ 代 理 人 弁理士 高橋 淳一

## 明 細 書

## 発明の名称

免疫学的簡易測定方法

## 特許請求の範囲

被験液中に含まれる抗原を、ラテックス粒子の粒径より大きい孔径を有する多孔質担体膜に担持された第1の抗体と反応させ、生成する抗原-抗体複合物を、該担体膜と異なる色のラテックス粒子に担持され、第1の抗体と抗原決定基を異にする第2の抗体と反応させることを特徴とする、被験液中の抗原の免疫学的測定方法。

## 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

本発明は、第1の抗体を多孔質膜に担持した抗体担持膜と第2の抗体をラテックス粒子に担持した抗体担持ラテックスを用い、肉眼により容易に判定可能な免疫学的測定方法に関する。

## (従来技術)

近年、生体物質例えばホルモン、血液因子、薬物、これらの代謝産物等の検出又は血中、尿中その他体液中における濃度の測定が疾患の病態、診断、予後の判定、治療法の決定などに重要な意義を持つようになってきた。これらの測定方法としては理化学的方法、生化学的方法、免疫学的方法などがあり、このうち免疫学的方法は微量成分を特異的に精度よく測定できることから、ホルモン、血液因子などの測定に広く応用されている。この方法は通常測定対象となる物質(以下「被測定物質」と呼ぶ)を抗原として、ウサギ、モルモット、ヒツジなどの動物を免疫して得た抗体を用い、その抗原-抗体反応を利用するものであり、測定手段、方法等によつて、ゲル内拡散法、免疫電気泳動、沈降反応、凝集反応、放射免疫測定法、酵素免疫測定法など種々の方法が考案され、利用されている。このうち、血球、カオリン、ベントナイト、ポリスチレンラテックス等の微粒子(担体)に抗

原又は抗体を吸着感作させた感作担体粒子と、それに対応する抗体もしくは抗原との反応を利用した凝集反応又は凝集阻止反応は、簡便で比較的感度がよいことから広く応用されており、この方法を用いた性腺刺激ホルモン、ステロイドホルモン、フィブリノゲン、FDP（フィブリン・フィブリノゲン分解産物）などの測定は臨床に広く用いられている。凝集反応又は凝集阻止反応に用いられる担体としては、血球及びポリスチレンラテックスが最も多く利用されており、特にラテックス凝集反応はガラス板上で極めて短時間に測定が行われることから、手軽であり、緊急を要する検査に特に利点を有している。しかしラテックス凝集反応及び凝集阻止反応では未反応のラテックス粒子の存在下で反応したラテックス粒子の凝集を見ることになるため、しばしば反応像が不明瞭となり判定が付きにくい場合がある。最近に至り、放射免疫反応における放射性物質の代わりに酵素を用いる酵素免疫反応（EIA）が広く用いられている。酵素免疫反応は、例えば酵素標識抗体を用

いて競合法又は非競合法により抗原-抗体反応を行い、抗原と結合した酵素標識抗体又は未結合の酵素と基質を反応させ、必要に応じ、さらに呈色剤を加えたのち、分光光度計を用いて比色することにより検体中の抗原量を測定する方法である。メンブラン、チューブなどに第1の抗体を固定したサンドイッチを原理としたRIAでは、前記のラテックス凝集反応及び凝集阻止反応より高い感度が得られるが、第1の抗体と検体の反応、第2の抗体-酵素結合物の反応及び呈色反応と3段階の反応が必要であり、反応時間がかかると共に操作が煩雑である。さらには、酵素免疫反応を利用し、比色計を用いることなく肉眼で判定する方法として、繊維の多孔性マトリックス内に抗体感作粒子を保持固定し、この抗体感作保持繊維上で被検液中の抗原と反応させ、洗浄後さらに酵素標識抗体と反応させ、余分な酵素標識抗体を洗浄除去したのち、基質溶液を加え、繊維上で発色した色により被検液中の被測定物質を検出する方法が知られている。

（特開昭62-228167号公報参照）。

このように酵素免疫反応は色の変化により被検液中の被測定物質の存在を認めることができるが、その測定には特別な場合を除き分光光度計などの特殊な装置が必要であり、また酵素を用いることから失活や保存安定性の面で問題が生じていた。一方、所望の成分又はこの成分に対する特異的結合剤をコロイド状金属粒子に結合させることにより得られる標識された成分を用いる方法が開示されている（特開昭60-185160号公報参照）。しかしコロイド状金属粒子を用いる方法は、反応を促進させるために加温したり、反応に長時間を必要としていた。また感度を高めるためにプロテイン媒体の表面に結合したコロイド状金属粒子に乳酸銀、硝酸銀などの物理的現像剤を用いてコントラストをだす必要があつた。しかも、これらのコロイド状金属粒子は保存安定性の面で問題があつた。

（問題点を解決するための手段）

そこで本発明者らは簡便な操作で容易に肉眼による判断ができ、かつ高感度な測定方法について研究した結果、ラテックス粒子の粒径より大きい孔径を有する多孔質担体膜に第1の抗体を担持させた抗体担持膜及び第1の抗体と抗原決定基の異なる第2の抗体を該担体膜と異なる色で着色したラテックスに担持させた抗体担持ラテックスを用いる方法を見出し、本発明を完成した。

本発明は、被検液中に含まれる抗原を、ラテックス粒子の粒径より大きい孔径を有する多孔質担体膜（以下担体膜という）に担持された第1の抗体と反応させ、生成する抗原-抗体複合物を、該担体膜と異なる色のラテックス粒子に担持され、第1の抗体と抗原決定基を具にする第2の抗体と反応させることを特徴とする、被検液中の抗原の免疫学的測定方法である。

本発明方法によれば、反応時間を短縮することができ、また高感度であるため測定結果の判定が容易である。

抗体を作製するために用いられる抗原としては例えば下記の抗原があげられる。

ペプチドホルモン例えば成長ホルモン(OH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、メラニン細胞刺激ホルモン(MSH)、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、オキシトシン、閉経婦人尿性腺刺激ホルモン(HMO)等の下垂体ホルモン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン等のカルシウム代謝調節ホルモン、インシュリン、プロインシュリン、グルカゴン等の膵ホルモン、ガストリン、セクレチン等の消化管ホルモン、アンギオテンシン、ブラジキニン等の血管に作用するホルモン、ヒト絨毛性乳腺刺激ホルモン(hCG)、ヒト胎盤催乳ホルモン(hPL)等の胎盤ホルモン等、及びホルモン以外の物質例えば前立腺癌腫性ホスファターゼ(PAP)、アルカリ性ホスファターゼ、~~乳酸脱水素酵素~~、乳酸脱水素酵素、トランスアミナーゼ、トリプシン、ペプシノーゲン等の酵

素、 $\alpha$ -フエトプロテイン(AFP)、ガン胎児性抗原(CEA)等のガン特異物質、免疫グロブリンG(IgG)、フィブリン-フィブリノゲン分解産物(FDP)、抗トロンビンIII(ATIII)、トランスフェリン等の血清蛋白成分、リウマチ因子、セロトニン、ウロキナーゼ、フェリチン、サブスタンスP等があげられる。

本発明に用いられる抗体は、公知の方法により、抗原を動物に投与して免疫し、抗体力価が所定値以上に達した動物から抗血清を採取し、必要に応じて精製することにより得られる。本発明においては抗原決定基を異にする抗体としてモノクロナル抗体も用いることができる。モノクロナル抗体は、公知の手法を適宜に選択、組み合わせてモノクロナル抗体産生融合細胞株を形成し、この細胞株を利用して産生、取得することができる(例えば特開昭60-20149号公報参照)。これらの抗体には抗体分子IgGを酵素で処理して得られるFab、Fab', F(ab')<sub>2</sub>の面分も含まれる。

担体膜及びラテックス粒子に担持させる抗体としては、被測定物に対して抗原決定基の異なる抗体が用いられる。例えば担体膜に担持させる第1の抗体としてモノクロナル抗体を用いる場合には、ラテックス粒子に担持させる第2の抗体として、第1のモノクロナル抗体と抗原決定基を異にするモノクロナル抗体又は同一抗原に対するポリクロナル抗体を用いる。また第1の抗体としてポリクロナル抗体を用いる場合には、第2の抗体としてモノクロナル抗体又はポリクロナル抗体を用いることができる。

本発明に用いられる担体膜としては例えば伊紙、セルロースアセテートメンブラン、ニトロセルロースメンブラン、イムノダイニンイムノアフィニティメンブランなどがあげられる。これらの担体膜は、膜表面に孔を有しており、その孔は膜の表面から裏面に達していることが必要であり、未反応のラテックス粒子が通過できるものである。このため担体膜の孔径は用いるラテックス粒子の粒径より大きいことが必要で

ある。担体膜の孔径は、通常は約0.2~10 $\mu$ m、好ましくは約0.45~1.0 $\mu$ mである。担体膜の孔径とラテックス粒子の直径の比は3:1~15:1が好ましい。

担体膜は、ラテックス粒子が白色のときは抗原に結合した第2の抗体担持ラテックスが明瞭に判別できるよう着色されている必要がある。これらの着色膜としては市販のメンブランフィルター、伊紙などが用いられる。

担体膜への第1の抗体の担持は常法により行うことができ、例えばセルロースアセテートメンブラン、ニトロセルロースメンブランへの抗体の担持は、乾燥メンブランに抗体溶液を滴下又は浸漬させ、乾燥したのち不活性蛋白質などで未反応部分をブロックして担持させることができる。また、伊紙を臭化シアンで活性化し、1級アミンとカップリングさせたのち抗体を結合させる方法、同様に臭化シアンで活性化し、エチレンジアミン化合物と低温で反応させ、 $\omega$ -アミノ誘導体を製造したのち抗体を加えるこ

とにより製造することができる(基礎生化学実験法2丸 株式会社参照)。イムノダイニンアフィニティメンブランへの抗体の担持も、公知の方法により行うことができる。

本発明に用いられる第2の抗体担持ラテックスとしては、従来のラテックス凝集又は凝集阻止反応で用いられる抗体担持ラテックスがあげられる。ラテックス粒子の例としては、ポリステレンラテックス、ステレン-ブタジエンコポリマーラテックス、ポリビニルトルエンラテックス、ビニルトルエン-メチルメタクリレートコポリマーラテックスなど、及び官能基としてカルボキシル基、第1級アミノ基又はカルボアミド基( $-CONH_2$ )を有し、かつ基体が前記ラテックスから成る反応性高分子ラテックスなどがあげられる。

ラテックス粒子の粒径は適宜に選択できるが、平均粒径が約0.01~2 $\mu m$ 、特に約0.05~0.8 $\mu m$ のものが好ましい。

担持ラテックス粒子を意味する。

抗体を吸着によりラテックス粒子に担持させるには、抗体の溶液とラテックス粒子の懸濁液を混合すればよく、これにより容易に第2の抗体担持ラテックス粒子が得られる。抗体は多くの場合カルボキシル基及び第1級アミノ基を有する。抗体を化学的にラテックス粒子に結合させるには、例えば前記の官能基を有する反応性高分子ラテックスと抗体を例えばカルボジイミド法を用いて結合させる。

第1の抗体担持膜及び第2の抗体担持ラテックス粒子の組み合わせから成る免疫化学的測定試薬としては、例えば下記の測定試薬があげられる。

- (1) 抗ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)モノクロナル抗体担持ニトロセルロースメンブランと抗hCGポリクロナル抗体担持ラテックス粒子、
- (2) 抗前立腺性ホスファターゼ(PAP)ポリクロナル抗体メンブランフィルターと抗PAPモノクロナル抗体担持ラテックス粒子、

ラテックス粒子は前記の担持膜が白色のときは、市販の着色したラテックス粒子、例えば日本合成ゴム社製ポリステレンラテックス粒子(赤、ピンク、青、黄、緑など)を用いることができる。また担持膜が白色以外の色で着色されている場合は、ラテックス粒子は抗原と結合したとき明瞭に判別できる色のものが用いられる。例えば担持膜が黄色のときは、ラテックス粒子の色は赤色、青色又は緑色など、また担持膜が青色のときはラテックス粒子の色は白色、黄色などコントラストの強い色を用いるのが好ましい。

前記のラテックス粒子に、被測定物質に対する第2の抗体を担持させる方法としては、公知の方法例えばラテックス粒子に抗体を物理的に吸着させる手法及び化学的に結合させる手法のいずれの手法も利用することができる。本発明において、第2の抗体担持ラテックス粒子とは、これらの任意の手法を適宜に選択利用してラテックス粒子に第2の抗体を担持させたすべての

モノクロナル抗体担持ラテックス粒子、

- (3) 抗 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)モノクロナル抗体担持伊紙と抗AFPモノクロナル抗体担持ラテックス粒子、
- (4) 抗ガン胎児性抗原(CEA)ポリクロナル抗体担持イムノダイニンイムノアフィニティメンブランと抗CEAモノクロナル抗体担持ラテックス、
- (5) 抗フィブリン・フィブリノゲン分解産物(FDP)モノクロナル担持ニトロセルロースメンブランと抗FDPモノクロナル抗体担持ラテックス、
- (6) 抗ヒト生長ホルモン(hCG)ポリクロナル抗体担持伊紙と抗hCGモノクロナル抗体担持ラテックスなど。

本発明を実施するに際しては、被検液中に含まれる抗原を担体膜に担持された第1の抗体と反応させる。

抗原と第1の抗体を反応させるには、第1の抗体担持膜に被検液又はその希釈液を滴下することが好ましい。これにより第1の抗体に被検

液中の抗原が結合し、抗原-抗体複合物が生成する。

次いで必要に応じ担体膜を水、緩衝液などで洗浄したのち、第2の抗体担持ラテックスを滴下し、抗原-抗体複合物と第2の抗体を反応させる。

次いで水、緩衝液などで洗浄し、未反応ラテックス粒子を洗い流す。

緩衝液としては例えばリン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液などが用いられ、これらは不活性蛋白質として牛血清アルブミン(BSA)、家兎血清アルブミン(RSA)などを含有していてもよい。0.05~0.2% BSA含有トリス-塩酸緩衝液を用いることが好ましい。

被検液中に抗原が存在すると、担体膜上に担体膜と異なる色の第2の抗体担持ラテックス粒子が結合され、抗原と結合しなかつた第2の抗体担持ラテックス粒子は膜の孔より流出され、抗原と結合した第2の抗体担持ラテックスだけが残る。このラテックス粒子が結合した部分の

担体膜の色が変わり、容易に肉眼により判別することができる。被検液中に抗原が存在しないときは、第2の抗体を担持したラテックス粒子は担体膜の孔より全て流出し、担体膜の色は変化しない。この際、第1の抗体を識別しやすい形状、例えば一定の直径を有するスポット状、星形、+などの記号として担体膜に担持しておくことが容易であり好ましい。また第1の抗体担持膜は、被検液の中へ浸漬してもよいが、予め筒状の容器、好ましくは検体を上から滴下したとき、下から吸取又は吸引できるような装置に保持することが好ましい。

#### 実施例1

##### (1-a) 抗hCG特異的モノクローナル抗体の製造

Balb/c マウスにhCG (10000 IU/mg) をコンプリートフロインドアジュバントと共に3週間隔で3回背部皮下投与し、さらに3週後hCGを腹腔内投与した。最終免疫3日後の脾細胞と骨髓腫細胞(NS-1)とを常法により細胞融合を行い、HAT選別後、クローニングを繰り返してhCG特異抗体を分泌する融合細胞株を得た。この融合細胞をブリスタン0.5 mlを予め腹腔内投与したBalb/cマウスの腹腔内に投与し、腹水腫瘍を形成させ、腹水を採取した。得られた腹水を硫酸分画、次いでアフィニティグルーピングAマブスキャット(affigel-protein A MAPS KIT, Biolad社製)によりIgGを精製し、凍結乾燥して白色粉末の抗hCG特異的モノクローナル抗体を得た。

##### (1-b) 抗hCGポリクローナル抗体の製造

家兎にhCG 1 mgをコンプリートフロインドア

ジュバントと共に背部皮下投与し、1カ月後にさらにhCGを3週間隔で2回皮下及び足趾投与を行い、最終免疫3週間後に全採血して血清を分離し抗血清を得た。得られた抗血清を56℃、30分間非働化後、硫酸分画、DEAE-セルロースクロマトグラフィ、セファデックスG200ゲル濾過により精製したのち凍結乾燥し、白色粉末の抗hCGポリクローナル抗体を得た。

##### (1-c) 抗hCG特異的モノクローナル抗体固定化メンブランの製造

孔径5 μmの白色のエトロセルロースメンブラン(東洋濾紙社製、直径20 mm)を精製水で洗浄して水切り後、37℃、湿度80%の恒温恒湿器中に15分間放置後、(1-a)で得られた抗hCGモノクローナル抗体の500 μg/ml (0.9% NaCl含有20 mMトリス-塩酸緩衝液、pH 8.2) 溶液を2 μlずつメンブランの中央部にスポットし、前記の恒温恒湿器中で30分間静置した。次いで抗体スポット部以外をブロックするために5% BSA 溶液に浸漬して37℃、45

分間加温した。トリス-塩酸緩衝液で2回洗浄し、0.1% BSA 含有トリス-塩酸緩衝液に浸漬後、水切り、乾燥し、白色の抗 hCG 特異的モノクロナル抗体固定化メンブランを製造した。

#### (1-d) 抗 hCG 抗体感作ラテックス試薬の製造

(1-b) で得られた抗 hCG ポリクロナル抗体 10  $\mu$ g を 4 ml のグリシン緩衝液 (pH 8.2) に溶解したのち、攪拌下に赤色ポリスチレンラテックス (固形分 10%、日本合成ゴム社製、粒径 0.303  $\mu$ ) 1.0 ml を滴下混合し、室温で 30 分間及び 56℃ で 80 分間攪拌を続けた。次いで冷却後、遠心分離した。得られた沈殿をグリシン緩衝液 1.0 ml に懸濁し、遠心分離する操作を 2 回繰り返したのち、沈殿を 1% BSA 含有グリシン緩衝液 1.0 ml に懸濁させ、室温で 1 時間攪拌したのち遠心分離した。この洗浄操作を 3 回繰り返したのち、0.1% BSA 含有グリシン緩衝液 2.0 ml に懸濁し、抗 hCG ポリクロナル抗体感作ラテックスを製造した。

#### (1-e) 測定法

(1-c) で製造した抗 hCG 特異的モノクロナル抗体固定メンブランを多孔性樹脂の上に載せ、支持枠にセットして反応に供した。0.1% BSA 含有トリス-塩酸緩衝液を用い、各種濃度の標 hCG 溶液を調製し、その溶液のそれぞれ 200  $\mu$ l を中央部に滴下して吸収させた。次いで (1-d) で得られた抗 hCG ポリクロナル抗体感作ラテックス試薬を 2 滴 (約 70  $\mu$ l) をその上に滴下し、試薬がメンブランに吸収されたのち、直ちに 0.1% BSA 含有トリス緩衝液 (pH 8.2) を滴下して未反応ラテックスをメンブラン下に洗浄除去し、肉眼により色着スポットの有無を判定した。対照として hCG 溶液の代わりに 0.1% BSA 含有トリス緩衝液を用いた。その結果を第 1 表に示す。

第 1 表

hCG 濃度 (IU/ml)	10	1	0.5	0.1	0.05	0.025	0.01	対照
判 定	+	+	+	+	+	±	-	-

表中の+は赤色のスポットが見られたもの、-は何ら着色がみられなかつたもの、±は極くわずかな着色されたものを示す。以下に示す実施例においても同様の意味を表わす。

次いで、妊婦尿 10 例について従来法 (ラテックス凝集反応法、感度 200 mIU/ml) と比較検討した。なお各妊婦尿中の hCG 濃度はラジオイムノアッセイ法 (RIA) にて定量した。その結果を第 2 表に示す。

第 2 表

妊婦尿番号	1	2	3	4	5
RIA値(mIU/ml)	1050	700	210	80	65
本発明方法	+	+	+	+	+
従 来 法	+	+	±	-	-

  

妊婦尿番号	6	7	8	9	10
RIA値(mIU/ml)	850	36	173	55	138
本発明方法	+	+	+	+	-
従 来 法	+	-	-	-	-

これより明らかなように本発明方法はラテックス凝集反応法に比して感度が高いことが知られる。なお反応操作は 2 分以内で行うことができる。

#### 実施例 2

##### (2-a) 抗 hLH 特異的モノクロナル抗体の製造

hLH を抗原として、実施例 (1-a) と同様に Balb/c マウスに免疫し、その脾細胞を用いて細胞融合を行い、hLH 特異的モノクロナル抗体を分泌する融合細胞株並びに hCG、hLH 及び hFSH と交差反応する  $\alpha$ -サブユニットを認識するモノクロナル抗体を分泌する融合細胞株を得た。各細胞株を予めブリスチン投与した Balb/c マウスの腹腔内に投与し、腹水腫瘍を形成させて腹水を得た。得られた腹水を硫酸分画及びアフィニティプロテイン A マブスキャットにより精製し、凍結乾燥して白色粉末のモノクロナル抗体を得た。得られた抗 hLH 特異的モノクロナル抗体はメンブラン固定に用い、 $\alpha$ -サブユニットを認識するモノクロナル抗体はラテックス

粒子の感作に用いた。

#### (2-b) 抗 hLH モノクロナル抗体固定化メンブ ランの製造

孔径 8  $\mu\text{m}$  の白色ニトロセルロースメンブラン（ザルトリウス社製）を直径 20 mm の円形に切断し、実施例 (1-b) と同様にして (2-a) で得られた抗 hLH 抗体を固定化して、抗 hLH 抗体固定化メンブランを製造した。

#### (2-c) 抗 hLH モノクロナル抗体感作ラテックス 試薬の製造

(2-a) で得られた  $\alpha$ -サブユニットを認識するモノクロナル抗体 2 mg を 4 ml のグリシン緩衝液 (pH 8.2) に溶解したのち、攪拌下、青色ポリスチレンラテックス（固形分 10%、日本合成ゴム社製、粒径 0.655  $\mu$ ）1.0 ml を滴下混合し、室温で 1 時間攪拌し、さらに 56℃ で 30 分間加熱した。冷却後、実施例 (1-d) と同様にして抗 hLH モノクロナル抗体感作ラテックス試薬を製造した。

#### (2-d) 測定法

実施例 (1-e) と同様にして、抗 hLH モノクロナル抗体固定メンブランを多孔性樹脂より成る吸収体の表面に装着し、これを支持枠にセットし、反応に供した。0.1% BSA 含有トリス緩衝液で各種濃度の hLH 溶液を調製し、その 500  $\mu\text{l}$  をメンブランに滴下吸収させ、次いで (2-c) で得た抗 hLH 抗体感作ラテックス試薬を 3 滴（約 100  $\mu\text{l}$ ）滴下した。試薬をメンブランに吸収させたのち、0.1% BSA 含有トリス緩衝液を滴下して未反応ラテックス試薬を洗浄除去した。対照として hLH 溶液の代わりに 0.1% BSA 含有トリス緩衝液を用い、同様に操作した。判定は肉眼により青色スポットの有無により行つた。その結果を第 3 表に示す。

第 3 表

hLH 溶液 (iu/ $\mu\text{l}$ )	1	0.5	0.25	0.1	0.05	0.025	対照
判 定	+	+	+	+	+	-	-

これより明らかなように測定感度 0.05 iu/ $\mu\text{l}$ （50 mIU/ $\mu\text{l}$ ）と極めて高感度な試薬が得られた。また測定に要した時間は 2 分以内であつた。  
実施例 3

#### (3-a) 抗 hFSH 特異的モノクロナル抗体の製造

hFSH を抗原として、実施例 (1-a) と同様にして Balb/c マウスに免疫し、その脾細胞を用いて細胞融合を行い、抗 hFSH 特異的モノクロナル抗体を分泌する融合細胞株を得た。この細胞株を予めプリスタン処理した B61b/c マウスの腹腔内に投与し、腹水腫瘍を形成させて腹水を得た。得られた腹水を硫酸分画及びアフィニティプロテイン A マブスキットにより精製したのち凍結乾燥し、白色粉末の抗 hFSH 特異的モノクロナル抗体を得た。このモノクロナル抗体はラテックス粒子を感作するのに用いた。

#### (3-b) 抗 HMO 抗体の製造

豚乳に HMO 1 mg をコンブリートフロインドアジュバントと共に背部皮下投与し、さらに皮下及び趾間投与により 3 週間隔で 2 回投与した。

最終免疫 3 週間後に全採血し、血清を分離して抗血清を得た。この抗血清を 56℃、30 分間非働化後、硫酸分画、DEAE-セルロースクロマトグラフィー、セファデックス G 200 グルゲ過により IgG を精製したのち凍結乾燥し、抗 HMO 抗体を得た。得られた抗 HMO 抗体はメンブランの固定に用いた。

#### (3-c) 抗 HMO 抗体固定化メンブランの製造

孔径 30  $\mu$  の黒色メンブラン（東洋伊紙社製）を直径 20 mm の円形に切断し、実施例 (1-c) と同様にして (3-b) で得られた抗 HMO 抗体を固定化し、抗 HMO 抗体固定化メンブランを製造した。

#### (3-d) 抗 hFSH 特異的モノクロナル抗体感作ラテ ックス試薬の製造

(3-a) で得られた抗 hFSH 特異的モノクロナル抗体 1 mg をグリシン緩衝液 (pH 8.2) 4 ml に溶解したのち、攪拌下に白色のポリスチレンラテックス（固形分 10%、ダウケミカル社製、粒径 0.103  $\mu$ ）1.0 ml を滴下混合し、室温で 1 時間攪拌後さらに 56℃、30 分間加熱した。



冷却後、実施例(1-d)と同様に洗浄操作を行い、0.1% BSA含有グリシン緩衝液(pH 8.2) 20 mlに懸濁し、抗hFSH特異的モノクロナル抗体感作ラテックス試薬を製造した。

#### (3-e) 測定法

(3-c)で得られた抗HMG抗体固定化メンブランと(3-d)で得られた抗hFSH特異的モノクロナル抗体感作ラテックス試薬を用い、実施例(1-e)と同様にしてhFSHを測定した。その結果を第4表に示す。

第 4 表

hFSH溶液 (iu/ml)	1	0.5	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	対照
判 定	+	+	+	+	+	+	-	-

#### 実施例 4

##### (4-a) 抗hPL抗体の製造

家兎にhPL 1 mgをコンブリートフロインドアジュバントと共に背部皮下投与し、1カ月後に

さらに皮下及び趾間投与を3週間隔で2回投与した。最終免疫3週間後に全採血して血清を分離し抗血清を得た。得られた抗血清を56℃、30分間非働化したのち、硫酸分画、DEAE-セルロースクロマトグラフィー及びセファデックスG-200によるゲル濾過によりIgGを精製し、さらに凍結乾燥して抗hPL抗体の白色粉末を得た。

##### (4-b) 抗hPL抗体固定化メンブランの製造

孔径3 μmのポルイムノダイニムノアフィニティメンブラン(ポール・ビオメディカル・プロダクト・コーポレーション製、白色)の乾燥メンブランを直径20 mmの内径に切断し、

(4-a)で製造した抗hPL抗体のリン酸緩衝液(10 mg/ml、pH 7.2)をメンブランの中央部に5 μgずつスポットしたのち室温で乾燥した。次いでリン酸緩衝液(pH 7.2)で3回洗浄後、5% BSAリン酸緩衝液(pH 7.2)に浸漬し、37℃、45分間加温した。次いで前記の緩衝液で3回洗浄後室温で乾燥して抗hPL固定化メンブ

ランを得た。

##### (4-c) 抗hPL抗体感作ラテックス試薬の製造

(4-a)で得られた抗hPL抗体5 mgを4 mlのグリシン緩衝液(pH 8.2)に溶解後、攪拌下、黒色ポリスチレンラテックス(日本合成ゴム社製、粒径0.209 μm) 1.0 mlを滴下混合し、室温で1時間攪拌し、さらに56℃で30分間加温した。冷却後、実施例(1-d)と同様に洗浄操作を行ったのち、0.1% BSA含有グリシン緩衝液20 mlに懸濁し、抗hPL抗体感作ラテックス試薬を製造した。

##### (4-d) 測定法

(4-b)で得られた抗hPL抗体固定化メンブランと(4-c)で得られた抗hPL抗体感作ラテックス試薬を用い、実施例(1-e)と同様にしてhPLを測定した。その結果を第5表に示す。

第 5 表

hPL濃度 (μg/ml)	1	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01	0.005	対照
判 定	+	+	+	+	+	+	+	-	-